

TARTU ÜLIKOOL
Füüsika-keemiateaduskond
Füüsikalise keemia instituut

KAIRI KIVIRAND

**BIOSENSORI KONSTRUEERIMINE BIOGEENSETE AMIINIDE
MÄÄRAMISEKS**

Magistritöö kolloid- ja keskkonnakeemia erialal

Juhendaja: vanemteadur Toonika Rinken, Ph.D.

Tartu 2007

SISUKORD

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Biogeensed amiinid	6
1.1.1 <i>Biogeensete amiinide leidumine toidus</i>	<i>7</i>
1.1.2 <i>Biogeensete amiinide määramise meetodid</i>	<i>7</i>
1.2 Biosensori mõiste ja tööpõhimõte	8
1.3 Amiini oksüdaasi iseloomustamine.....	9
1.3.1 <i>Amiini oksüdaasi leidumine, eraldamine ja puhastamine.....</i>	<i>9</i>
1.3.2 <i>Amiini oksüdaasi katalüütilised omadused</i>	<i>10</i>
1.4 Ensüümide immobiliseerimine mittelahustuva kandjale.....	12
1.4.1 <i>Nailon - potentsiaalne mittelahustuv kandja ensüümi immobiliseerimiseks....</i>	<i>13</i>
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	14
2.1 Kasutatud reaktiivid	14
2.2 Kineetiliste mõõtmiste aparatuur ja metoodika.....	15
2.3 Reaktsiooni iseloomustavate parameetrite arvutamine	16
2.4 Amiini oksüdaasi eraldamine ja puhastamine.....	17
2.5 Amiini oksüdaasi immobiliseerimine.....	18
2.5.1 <i>Immobiliseerimine nailonile dimetüülsulfaadi abil.....</i>	<i>18</i>
2.5.2 <i>Immobiliseerimine nailonile glutaaraldehüüdi abil.....</i>	<i>19</i>
2.6 Amiinide biosensori valmistamine.....	19
2.7 Biogeensete amiinide analüüs kala proovides.....	20
2.7.1 <i>Proovide ettevalmistamine</i>	<i>20</i>
2.7.2 <i>Proovide derivatiseerimine</i>	<i>20</i>
2.7.3 <i>HPLC analüüsi tingimused</i>	<i>20</i>
3 TULEMUSED JA ARUTELU	21
3.1 Amiini oksüdaasi puhastamine ning puhastamisprotsessi efektiivsuse hindamine .	21
3.2 Ensüümi katalüütiliste omaduste uurimine amperomeetriliselt	23

3.2.1	<i>Biogeensete amiinide koosmõju</i>	26
3.3	Amiini oksüdaasi immobiliseerimine.....	28
3.3.1	<i>Amiini oksüdaasi immobiliseerimine nailonile dimetüülsulfaadi abil</i>	28
3.3.2	<i>Amiini oksüdaasi immobiliseerimine nailonile glutaaraldehüüdi abil</i>	29
3.4	Biogeensete amiinide kontsentratsiooni määramine kalas biosensoriga ja HPLC meetodil	30
3.5	Eksperimendi edasine planeerimine	32
KOKKUVÕTE		33
SUMMARY.....		34
TÄNUAVALDUSED		35
KASUTATUD KIRJANDUS		36

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID

E_{red}	- ensüümi redutseeritud vorm
E_{oks}	- ensüümi oksüdeeritud vorm
I_t	- biosensori väljundvool ajamomendil t
I_0	- biosensori väljundvool reaktsiooni algmomendil $t=0$
A	- biosensori väljundsignaali kogumuutus ajast $t \rightarrow \infty$ (statsionaalne olek)
B	- kineetiline parameeter, mis iseloomustab algkiirust
τ_s	- ajakonstant, mis iseloomustab sensori inertsi
$[E]_{\text{üld}}$	- ensüümi kontsentratsioon lahuses
$k_{dif}^{O_2}$	- hapniku näiv difusioonikoefitsient
k_{kat}^*	- protsessi näiv katalüütiline konstant
C_s^{lahus}	- substraadi kontsentratsioon lahuses
K_{O_2}	- ensüüm-hapnik kompleksi dissotsiatsiooni konstant
K_m	- Michaelis-Menteni konstant
$HPLC$	- kõrgefektiivne vedelikkromatograafia

SISSEJUHATUS

Biogeensed amiinid on aminorühma sisaldavad ühendid, mis tekivad enamasti aminohapete dekarboksüleerimisprotsessi tulemusena. Need on tugevat bioaktiivset toimet omavad ained, mis signaalimolekulidena vahendavad organismis toimuvaid protsesse, kuid mille liiga kõrge kontsentratsioon võib põhjustada allergilisi reaktsioone. Organismi võivad biogeensed amiinid sattuda lisaks aminohapete dekarboksüleerumisele ka toidu või ravimitega. Toiduainetes tekivad biogeensed amiinid säilitamise käigus, aga ka termilise või bakteriaalse töötlemise tulemusena ning nende suurenenud kontsentratsiooni on täheldatud just kääritatud ning roiskunud toidus.

Tänapäeval kasutatakse biogeensete amiinide määramiseks peamiselt kromatograafilisi meetodeid. Kuna need meetodid nõuavad aga proovide spetsiaalset ettevalmistamist, kallist aparatuuri ning kõrgelt kvalifitseeritud tööjõu olemasolu, otsitakse odavamaid, kiiremaid ja lihtsamaid meetodeid. Üheks alternatiiviks on biosensorite kasutamine, nende eeliseks on analüüsi odavus, kiirus ja lihtsus. Samuti pole vajalik proovide eeltöötlus ning analüüse on võimalik teostada kohapeal.

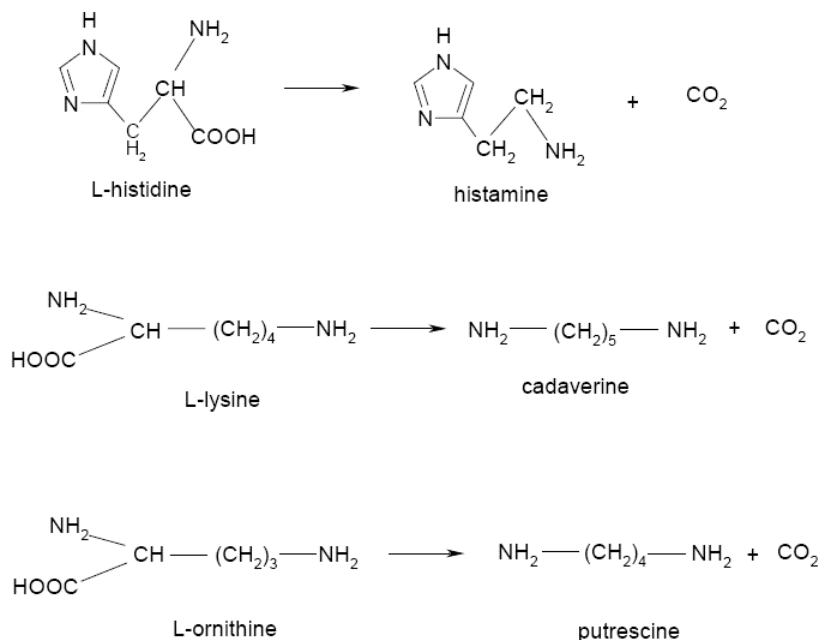
Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida võimalusi biogeensete amiinide biosensori konstrueerimiseks, kasutades bioselektiivse elemendina herneidudest eraldatud amiini oksüdaasi ja baaselektroodina Clarki'i tüüpi hapnikuandurit. Töös iseloomustatakse ensüümi eraldamise ja puhastamise efektiivsust ning katalüütilisi omadusi erinevate amiinide ja amiinide segude suhtes. Eraldatud amiini oksüdaasi kasutamiseks biosensori bioselektiivse elemendina immobiliseeritakse ensüüm erinevaid meetodeid kasutades niidikujulisele nailonkandjale ning uuritakse immobiliseeritud ensüümi aktiivsust kadaveriini suhtes. Amiini oksüdaasil baseeruvat biosensorit kasutatakse biogeensete amiinide määramiseks kala proovides ning saadud mõõtetulemusi võrreldakse kõrgefektiivse vedelikkromatograafia andmetega.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Biogeensed amiinid

Biogeensed amiinid on alifaatsed (putrestsiin, kadaveriin, spermidiin, spermiin), aromaatsed (türamiin, fenüüetüülamiin) või heterotsüklilised (histamiin, trüptamiin) aminorühma sisaldavad ühendid, mis tekivad enamasti aminohapete dekarboksüleerumisprotsessi tulemusena orgaanilise aine lagunemisel, kusjuures neil on enamasti tugev ebameeldiv lõhn^[1-3]. Kadaveriini nimetatakse seetõttu sageli ka laibamürgiks.

Mitmete biogeensete amiinide funktsiooniks elusorganismides on närvisüsteemi signaalide ülekanded (dopamiin, türamiin ning mõningad monoamiinid). Need ühendid on tugeva psühhotroopse toimega ning neil arvatakse olevat seos inimeste psüühika ja mitmete närvisüsteemi haigustega^[1,4]. Organismi võivad biogeensed amiinid sattuda aminohapete dekarboksüleerumisel, ravimite ning toiduga^[1]. Olulisemad biogeensed amiinid nagu putrestsiin, kadaveriin ja histamiin tekivad vastavalt arginiini (ornitiin), lüsiini ja histidiini lagunemisel (joonis 1) ning on orgaaniliste ühendite roiskumisprotsessi toimumise olulised indikaatorid.



Joonis 1. Toiduainetes enim leiduvate biogeensete amiinide tekkimine aminohapete dekarboksüleerumisel.

Putrestsiini ja kadaveriini määramine toiduainetes on oluline ka sellepärast, et lisaks enda toksilisusele suurendavad nad ka histamiini toksilisust elusorganismidele ^[1,3].

1.1.1 Biogeensete amiinide leidumine toidus

Biogeenseid amiine võib leida väga erinevates toiduainetes – lihas, kalas, šokolaadis, hapukapsas, õlles, punases veinis, juustus jne. Enim levinud on monoamiinidest histamiin, türamiin ja trüptamiin ning diamiinidest putrestsiin ja kadaveriin. Polüamiinid spermiin ja spermiin tekivad putrestsiinist ^[1,2].

Toiduainetes tekivad biogeensed amiinid enamasti säilitamise käigus, aga ka termilise või bakteriaalse töötlemise tulemusena ning nende eriti kõrget kontsentratsiooni on täheldatud kääritatud ning roiskunud toidus ^[1]. Seetõttu omab nende määramine suurt tähtsust toidu kvaliteedi ja värskuse hindamisel.

1.1.2 Biogeensete amiinide määramise meetodid

Tänapäeval kasutatakse amiinide määramiseks mitmeid viise, enim kasutust on leidnud kromatograafilised meetodid – planaarkromatograafia (TLC) ning kõrgefektiivne vedelik kromatograafia (HPLC) ^[1,3-5]. TLC meetod on kergesti läbiviidav ja ei vaja spetsiaalset aparatuuri, kuid vajalik on proovide ettevalmistamine ning meetod on vaid poolkvantitatiivne. HPLC meetod on biogeensete amiinide määramisel üks olulisemaid, sest võimaldab väga väikeste ainehulkade määramist. Kromatograafiliste meetodite olulisemaks eeliseks ongi nende suur tundlikkus ja täpsus ^[1], kuid suurimaks puuduseks on aeganõudev proovide ettevalmistamine. Vajalik on ka proovide derivatiseerimine, milleks peamiselt kasutatakse dansüül-, dabsüül- ja bensoüülkloriidi ning o-ftaalaldehüüdi (OPA). OPA reageerib väga kiiresti just primaarsete amiinidega redutseerivate reagentide (2-merkaptotetanool, N-atsetüültsüsteiin) juuresolekul, kuid saadud derivaadid on ebastabiilsed. Dabsüül- ja dansüülkloriid reageerivad nii primaarsete kui ka sekundaarsete amiinidega, andes stabiilsed derivaadid. Enim kasutust on leidnud dansüülkloriid. HPLC detektoritena on kasutusel fluoretsents-, UV- või elektrokeemilised detektorid. Ülevaade HPLC meetodi läbiviimise erinevatest tingimustest biogeensete amiinide määramiseks on toodud Önal, A., 2007 ^[1]. Kromatograafiliste meetodite kõrval kasutatakse ka kapillaarelektroforeesi (CE), millel on hea lahutusefektiivsus ja väike analüütide kulu. CE kasutatakse enamasti heterotsükliliste ja aromaatsete amiinide määramiseks ^[1].

Üheks võimalikuks alternatiiviks traditsioonilistele biogeensete amiinide määramise meetoditele on biosensorite kasutamine, nende eeliseks on analüüsi odavus, kiirus ja lihtsus. Biosensorite kasutamisel jääb ära aeganõudev proovide ettevalmistamine ning analüüse on võimalik teostada kohapeal ^[1]. Biogeensete amiinide määramiseks kasutatavad biosensorid baseeruvad oksüdaasidel ning erinevatel elektrokeemilistel anduritel. Nende tundlikkuseks on kirjanduse andmetel pakutud 10^{-6} – 10^{-9} M. Biogeensete amiinide biosensoritest ja nende määramispiiridest annab ülevaate tabel 1.

Tabel 1. Biogeensete amiinide määramiseks kasutatud amiini oksüdaasidel baseeruvad biosensorid; His: histamiin; Put: putrestsiin; Cad: kadaveriin; Tyr: türamiin; Spd: spermidiin; Spm: spermiin; n.a.: pole antud; LOD: tundlikkus; LR: lineaarne ala.

Määratavad aine	LOD (μM)	LR (μM)	Elektrood
Put	10 nM	0,01-100	Süsinikelektrood ^[6]
Put, Cad, His	25	n.a.	Pt elektrood ^[7]
Put, His	0,5 nM	0,9-70 nM	HiTrap TM NHS-aktiveeritud kolonn ^[8]
Spd	7,1 nM	n.a.	Süsinikelektrood ^[9]
His, Cad, Put	0,6	1-100	Pt elektrood ^[10]
His	2,2	10-200	Grafiitelektrood ^[11]
Cad, Put, His, Spd, Tyr	0,5	1-50	Pt elektrood ^[12]
Cad, Spm	2,0	n.a.	Süsinikelektrood ^[13]
Cad, Put, Spd, Spm	0,2	0,5-10	Pt elektrood ^[14]
His, Put	n.a.	0,17-20	Pt elektrood ^[15]
His	0,1	0-100	Klaassüsinik elektrood ^[10]

1.2 Biosensori mõiste ja tööpõhimõte

Biosensor on integreeritud analüütiline süsteem, milles on ühendatud bioloogiliselt aktiivne komponent, mille abil toimub määratava aine molekulide äratundmine ning selle äratundmisreaktsiooni signaali mõõdetavaks signaaliks muundav seade. Biosensorid

ühendavad nii biokomponentide kõrge selektiivsuse kui ka elektrokeemilise analüüsi täpsuse ja kiiruse^[16,17].

Bioselektiivseks elemendiks võivad olla ensüümid, antikehad, mikroorganismid jm. bioaktiivsed materjalid, mis on viidud võimalikult tihedasse kontakti signaali registreeriva seadmega. Bioloogiline materjal võib olla otseselt seotud sensori pinnale või moodustada osa õhukesest sensoripinda katvast membraanist^[16].

Biosensorite kasutamine võrreldes traditsiooniliste kromatograafiliste ja spektrofotomeetriliste analüüsimeetoditega on tunduvalt lihtsam ja odavam^[16-18]. Peamiseks biosensorite puuduseks on sobiva tööpiirkonna leidmine, bioaktiivse komponendi inaktiveerumine ajas ning tundlikkuse vähenemine korduval kasutamisel.

Biosensorite rakendusallasid on tänapäeval mitmeid, kõige enam kasutatakse neid tervishoius, tööstuslike protsesside kontrollimisel ning keskkonnamonitooringus.

1.3 Amiini oksüdaasi iseloomustamine

Amiini oksüdaasid on ensüümid, mis katalüüsivad amiinide oksüdeerumist hapniku toimetel. Nad esindavad ensüümide klassi, mida jagatakse kaheks rühmaks. Ensüümid, mille molekulis on flaviinadeniin nukleotiid kuuluvad nn. FAD-sisaldavate amiini oksüdaaside rühma (FAD-AO, EC 1.4.3.4). Flaviini sisaldavate amiini oksüdaasidel on mitmeid triviaalnimetusi, näiteks türaminaas, polüamiini oksüdaas, spermiini oksüdaas jne.^[19] Vaske-sisaldavad amiini oksüdaasid sisaldavad kovalentselt seondunud Cu^{II} iooni (Cu-AO, EC 1.4.3.6). Vaske-sisaldavate amiini oksüdaaside triviaalnimetused on histaminaas, diamiini oksüdaas, SSAO (*semicarbazide-sensitive amine oxidase*)^[19]. Need kaks amiini oksüdaaside rühma on selgesti eristatavad nii substraatide, nende inhibiitorite kui ka bioloogiliste funktsioonide poolest^[20,21].

1.3.1 Amiini oksüdaasi leidumine, eraldamine ja puhastamine

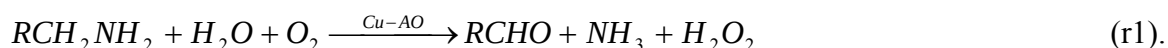
Amiini oksüdaasi leidub väga laialdaselt: mikroorganismides, pärmis, seentes, erinevates taimedes ja loomades^[21-29]. Taimede seemnetes, mis ei ole veel idanema hakanud, amiini oksüdaas puudub ning hakkab tekkima alles idanemisprotsessi käigus. Ensüümi aktiivsus on suurim taime kasvavates osades ja langeb taime vananemisel^[28,30,31]. Olenevalt organismist on vaske sisaldavatel amiini oksüdaasidel väga erinevad funktsionaalsed rollid. Taimedes osalevad amiini oksüdaasid rakkude kasvamisprotsessis, reguleerides di- ja polüamiinide taset

raku sees. Loomsetes organismides osalevad amiini oksüdaasid rakusisestes signalisatsiooniprotsessides ning detoksifikatsioonil ^[23]. Enim kasutust leidnud lähtematerjaliks amiini oksüdaasi eraldamiseks on taimed, eriti aga liblikõielised. Selle peamiseks põhjuseks on taimede lihtne kättesaadavus ning algmaterjali odavus võrreldes loomsete või bakteriaalsete materjalidega. Kirjanduse andmetel on liblikõielistest eraldatud amiini oksüdaasid ka kõrgemate ensümaatiliste aktiivsustega kui loomset ja bakteriaalset päritolu ensüümid.

Taimedest puhastatakse amiini oksüdaasi enamasti lihtsat standardmeetodi abil, mis seisneb homogeniseerimises, ensüümi väljasoolamises ja erinevate kromatograafiliste meetodite rakendamises ^[28,32-34]. Esmakordselt puhastati amiini oksüdaasi taimsest materjalist aastal 1948, kusjuures toona oli algmaterjaliks spinat ^[35]. Käesoleval ajal kasutatakse algmaterjalina väga erinevaid allikaid, seejuures erinevatest algmaterjalidest eraldatud ensüümide katalüütilised omadused erinevad suuresti.

1.3.2 Amiini oksüdaasi katalüütilised omadused

Vaske-sisaldavad amiini oksüdaasid katalüüsivad mono- ja polüamiinide, sealhulgas ka mitmesuguste biogeensete amiinide, oksüdeerumist hapniku toimel. Summaarne reaktsiooni skeem on järgmine ^[23]:



Reaktsioon toimub kahes etapis nn. ping-pong mehhanismi alusel ^[23]:



kus E_{oks} ensüümi oksüdeeritud ja E_{red} redutseeritud vorm. Reaktsiooni I etapis seostub ensüümi molekuliga amiin ning tekib aldehüüd ja ensüümi redutseeritud vorm, mis on võimeline siduma endaga hapnikku. Reaktsiooni II etapis vabaneb ammoniaak ja ensüümi oksüdeeritud vorm ^[23]. Kofaktoriks on vaske sisaldavate amiini oksüdaasidel TPQ (2,4,5-trihüdrosüülfenüülalaniinkinoon) ^[23,36].

Amiini oksüdaasi aktiivsus sõltub paljudest faktoritest, millest olulisem on aktiivtsentri kättesaadavus substraadi molekulidele. Põhisubstraadid amiini oksüdaasidele on 1,4-diaminobutaan ja 1,5-diaminopentaan, mis tekivad roiskumisprotsessi tulemusena^[37]. Herneidudest eraldatud amiini oksüdaasil on kirjanduse andmetel suhteline eriaktiivsus 100% 1,4-diaminobutaani (putrestsiini), 111% 1,5-diaminopentaani (kadaveriini), 56% agmatiini ja spermidiini, 44% 1,6-diaminoheksaani, 30% histamiini ja 8% spermiini suhtes^[28,38]. Liblikõielistest taimedest eraldatud amiini oksüdaasidele eri autorite poolt määratud konstandi K_m väärtused olulisemate biogeenstete amiinide suhtes on toodud tabelis 2.

Klassikalised ensüümkinetika uurimused on näidanud, et Li^+ ja Na^+ -ioonid on amiini oksüdaasile nõrgad mittekonkureerivad inhibiitorid; seevastu suuremad leelismetallide ionid nagu K^+ , Rb^+ ja Cs^+ inhibeerivat mõju ei oma^[39-41].

Tabel 2. Liblikõielistest puhastatud amiini oksüdaasi K_m väärtused erinevate substraatide jaoks.

Substraadid	K_m (mM)		
Putrestsiin	0,20	Harilik hernes	[42]
	0,09	Põldseahernes	[43]
	0,16	Harilik hernes	[44]
	0,43	Harilik hernes	[45]
	0,27	Põldseahernes	[45]
Kadaveriin	0,13	Põld-seahernes	[43]
	0,4	Harilik lääts	[46]
	0,21	Esparsett-hiirehernes	[46]
	0,11	Lambalääts	[47]
	0,26	Harilik hernes	[44]
	0,10	Põldseahernes	[45]
Histamiin	0,22	Harilik hernes	[6]
	0,79	Põldseahernes	[45]

1.4 Ensüümide immobiliseerimine mittelahustuvale kandjale

Ensüümide katalüütilise aktiivsuse säilitamiseks ja suurendamiseks ning nende korduvas kasutamiseks immobiliseeritakse biosensorites kasutatavad ensüümid tavaliselt mittelahustuvatele kandjatele, mis on integreeritud signaali muunduriga.

Immobiliseeritud ensüümide kasutamisega on võimalik biosensorsüsteemide tööd oluliselt parandada, kuna ^[48,49].

- a) solubiliseeritud ensüümid on ebastabiilsed ning pole seetõttu hästi rakendatavad süsteemides, kus töötatakse orgaaniliste lahustitega või juhtudel, kus on tegemist kõrgete temperatuuridega,
- b) ensümaatilisi reaktsioone kasutavate mittepidevate tehnoloogiliste protsesside korral on tehniliselt väga raske ensüümi reaktsioonisegust peale reaktsiooni toimumist uuesti kätte saada, millega oleks võimalik käivitada uus reaktsioon.

Seevastu immobiliseeritud ensüüme saab:

- a) kasutada korduvalt,
- b) nad on stabiilsemad kui lahustunud vormis ensüümid ning neid on võimalik kasutada pidevprotsesside läbiviimisel ^[48,49].

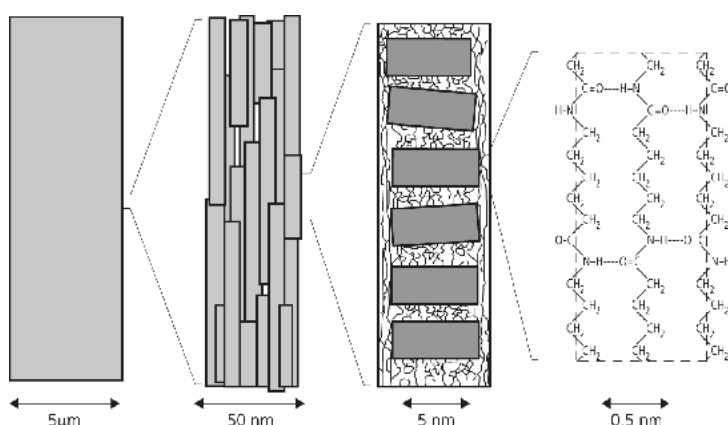
Ensüümide immobiliseerimise peamiseks probleemiks on funktsionaalse struktuuri säilitamine ning steriiliste takistuste vältimine aktiivtsentritele.

Ensüümide immobiliseerimise meetodeid on mitmeid. Enim kasutust on leidnud ensüümi kovalentne sidumine kandjale ^[48], kuna võimaldab saada väga stabiilse sideme ensüümi molekuli ja kandja vahel. Kovalentse sideme moodustamiseks vajalike reaktsioonitingimuste valikul tuleb silmas pidada, et need ei põhjustaks ensümaatilise aktiivsuse kadumist. Samuti ei tohi kasutatud reagentid mõjutada ensüümi aktiivtsentreid ning reaktsiooni keskkond peab olema ensüümile optimaalne (pH, temperatuur). Kovalentse sideme moodustamiseks kasutatakse enamasti vabu karboksüül-, amino-, hüdroksüül-, sulfhüdrüül- ja fenoolrühmi, mis tekitatakse kandjale selle aktiveerimise käigus. Sagedasti kasutatakse ka nn. linker'it (näiteks glutaaraldehüüd, diisotsüanaat), mis on vahelüliks ensüümi ja kandja vahel ning annab ensüümi molekulile parema liikuvuse ja suurema aktiivsuse ^[48]. Tänapäeval on hakatud immobiliseerimiseks kasutama ka nn. lukustamise meetodit, mille käigus ensüüm seotakse kas maatriksisse või „lukustatakse” mikrokapslitesse ^[50,51]. Maatriksiteks võivad olla nii sünteetilised kui ka looduslikud polümeerid. Kapseldamise korral sisestatakse ensüümid erinevatest polümeeridest kapslitesse, mille läbimõõdud jäävad vahemikku 5- 300 µm ^[50,51].

Ensüümimolekulid ei mahu oma mõõtmete tõttu membraanide pooridest läbi, küll aga mahuvad sealt läbi substraatide ja produktide väiksemad molekulid.

1.4.1 Nailon - potentsiaalne mittelahustuv kandja ensüümi immobiliseerimiseks

Kandjana ensüümide immobiliseerimisel on kasutatud väga mitmeid polümeerseid materjale. Kandja valikul tuleb silmas pidada, et materjal oleks piisavalt tugev, stabiilne ning vastupidav reagentide ja temperatuuri suhtes. Üks enim kasutust leidnud kandjaks on nailon, kuna materjal on ohutu, inertne ning kergesti kätte saada erinevates vormides (pulber, torud, niit, membraanid jne.). Peamiseks nailoni eeliseks on selle tugev hüdrofiilsus^[48,52]. On teada, et nailoni pinnal on üksikud vaba rühmad, mille kaudu on võimalik ensüümi sidumine kandjale. Reaktsiooni tsentrite arvu suurendamiseks on vajalik nailoni pinna eelnev töötlemine^[52,53]. Nailoni pinna struktuur on toodud joonisel 2.



Joonis 2. Nailoni pinna struktuur.

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Kasutatud reaktiivid

Ammooniumhüdroksoid NH_4OH 25 % (Reachim, Venemaa)
Ammooniumsulfaat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Reachim, Venemaa)
Dansüülkloriid (Sigma)
Dietüüaminoetüül-tselluloos (DEAE-tselluloos, Amersham Bisciences, Rootsi)
Dimetüülsulfaat (VEB Laboratorchemie Apolda)
Glutaaraldehüüd 25 %-line (Reanal, Ungari)
Kaaliumdivesinikfosfaat KH_2PO_4 (Reachim, Venemaa)
Kaaliumvesinikfosfaat (Reachim, Venemaa)
Metanool (puhtus 99+%, Sigma)
Na-hüdroksoid NaOH (Chemapol, Tšehhoslovakkia)
Perkloorhape HClO_4 (Keemilise füüsika instituut)
Sephadex G-200 (Pharmacia, Rootsi)
Sooda NaHCO_3 (Orgaanilise ja bioorgaanilise keemia instituut)
Soolhape HCl (Fisher ChemAlert Guide)
Trietüülaminoetüül-tselluloos (TEAE-tselluloos, Reachim, Venemaa)
Trikloroäädikhape CCl_3COOH (Orgaanilise ja bioorgaanilise keemia instituut)

Amiini oksüdaasi substraatidena kasutati:

1,2-diaminoetaan (Orgaanilise ja bioorgaanilise keemia instituut)
1,3-diaminopropaan (Orgaanilise ja bioorgaanilise keemia instituut)
1,4-diaminobutaan (putrestsiin) (Sigma)
1,5-diaminopentaan (kadaveriin) (Orgaanilise ja bioorgaanilise keemia instituut)
1,6-diaminoheksaan (Orgaanilise ja bioorgaanilise keemia instituut)
1,7-diaminoheptaan (Orgaanilise ja bioorgaanilise keemia instituut)
1-aminobutaan (Orgaanilise ja bioorgaanilise keemia instituut)
histamiin (Fluka AG)
dopamiin (Sigma)

Sephadex G-200 kolonni kalibreerimiseks kasutati:

dekstriinsinine (Reanal, Ungari)
alkoholi oksüdaas (EC 1.1.3.13, Sigma)
glükoosi oksüdaas (EC 1.1.3.4, Sigma)
katalaas (EC 1.11.1.6, Sigma)
bovine serum albumine (Reachim, Venemaa)
kaaliumdikromaat (Reachim, Venemaa)

2.2 Kineetiliste mõõtmiste aparatuur ja metoodika

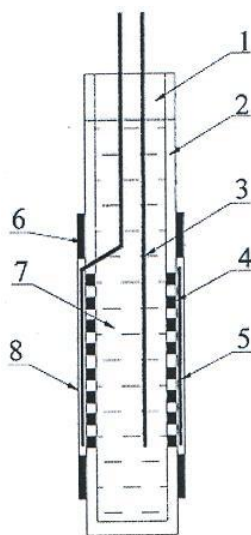
Amiini oksüdaasi aktiivsuse määramiseks kasutati baasandurina amperomeetrilist Clark'i tüüpi hapnikuandurit, mis võimaldas jälgida hapniku kontsentratsiooni muutumist ensüümi poolt katalüüsitava reaktsiooni käigus. Sensor töötab galvaanilise elemendina, mille katoodil toimub elektrokeemiline hapniku redutseerumine:



Hapnikuanduri katoodiks on kroom-nikkeltraat, mis on keritud anduri korpusele. Katoodi välispind on kaetud polüetüleenkilega, mis on takistuseks suurtele molekulidele ja ioonidele, kusjuures hapnik difundeerub piisava kiirusega, et tagada registreeritav vool. Anduri korpuses asub pressitud kaadmiumilaastudest anood, millel toimub kaadmiumi oksüdatsioon:



Clark'i tüüpi hapnikuanduri ehitusest annab ülevaate joonis 3.



Joonis 3. Clark'i tüüpi hapnikuanduri läbilõige: 1 – tihend, 2 – korpus, 3 – anood, 4 – korpuse perforatsioon, 5 – katood, 6 – kapronniit, 7 – elektrolüüdilahus, 8 – polüetüleenkile.

Kasutatud anduri membraani pinna suurus oli $5,65 \text{ cm}^2$ ja polüetüleenkile paksus $60 \text{ }\mu\text{m}$. Mõõterakuna kasutati õhukindlat klaasnõud ($V = 40 \text{ ml}$), milles asuvat reaktsioonisegu segati pidevalt magnetsegaja abil. Rakus olev hapnikuandur ühendati arvutiga, mis võimaldas andmete automaatset registreerimist ja salvestamist.

Kineetilised mõõtmised viidi läbi temperatuuril $25 \text{ }^\circ\text{C}$ $0,1 \text{ M}$ fosfaatpuhvrise valmistatud substraatide lahustes ($\text{pH } 7,00$). Kõik lahused valmistati Milli-Q veest ning puhvrite pH kontrolliti täpsusega $\pm 0,02$ ühikut. Hapnikuandur asetati õhuhapnikuga küllastatud mõõtelahusega täidetud mõõterakku ning lasti väljundvoolul stabiliseeruda. Seejärel süstiti mõõterakku reaktsiooni käivitamiseks herneidudest eraldatud ensüümi ($100 \text{ }\mu\text{l}$). Biosensori väljundvool registreeriti 1 sekundilise intervalliga.

2.3 Reaktsiooni iseloomustavate parameetrite arvutamine

Iga eksperimentaalne kõver sisaldas 1000 - 2000 punkti. Eksperimentaalsete andmete töötlemisel keskmistati andmed keskkonnast põhjustatud müra vähendamiseks üle 10 tulemuse. Seejärel andmed normaliseeriti I_t/I_0 .

Biosensori normaliseeritud väljundvoolu I_t/I_0 iseloomustamiseks ja reaktsiooniparameetrite leidmiseks kasutati amperomeetrilise biosensori mudelit, mis kirjeldab väljundvoolu muutust ajas ^[54,55].

$$\frac{I_t}{I_0} = A \cdot \exp(-Bt) + (1 - A) - 2 \cdot A \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \cdot \frac{\tau_s}{n^2 / B - \tau_s} \cdot \left[\exp(-Bt) - \exp(-n^2 \cdot \frac{t}{\tau_s}) \right] \quad (\text{v1}),$$

kus I_t on biosensori väljundvoolu suurus ajahetkel t ; I_0 väljundvoolu suurus reaktsiooni algmomendil $t = 0$, τ_s on hapnikuanduri inertsiooni iseloomustav suurus ning A ja B on substraatidele iseloomulikud kompleksparameetrid, mis avalduvad järgmiselt:

$$A = \frac{k_{kat}^* \cdot [E]_{\text{üld}} \cdot C_s^{\text{lahus}}}{K_{dif}^{O_2} \cdot K_{O_2} \cdot K_s + (k_{kat}^* \cdot [E]_{\text{üld}} + k_{dif}^{O_2} \cdot K_{O_2}) \cdot C_s^{\text{lahus}}} \quad (\text{v2}),$$

$$B = \frac{\frac{k_{kat}^* [E]_{\text{üld}}}{K_{O_2}} c_s^{\text{lahus}}}{K_s + c_s^{\text{lahus}}} + k_{dif}^{O_2} \quad (v3),$$

kus k_{kat}^* protsessi näiv katalüütiline konstant, $[E]_{\text{üld}}$ on ensüümi kontsentratsioon lahuses, c_s^{lahus} substraadi kontsentratsioon lahuses, $k_{dif}^{O_2}$ hapniku näitav difusioonikoefitsient ning K_{O_2} ja K_s iseloomustavad vastavalt hapniku sidumist aktiveeritud ensüümiga ja ensüüm-hapnik kompleksi moodustumist. *Parameeter A* vastab väljundsignaali kogumuutusele ja *B* on kineetiline parameeter. Mõlemad arvutatud parameetrid sõltuvad substraadi kontsentratsioonist hüperboolselt.

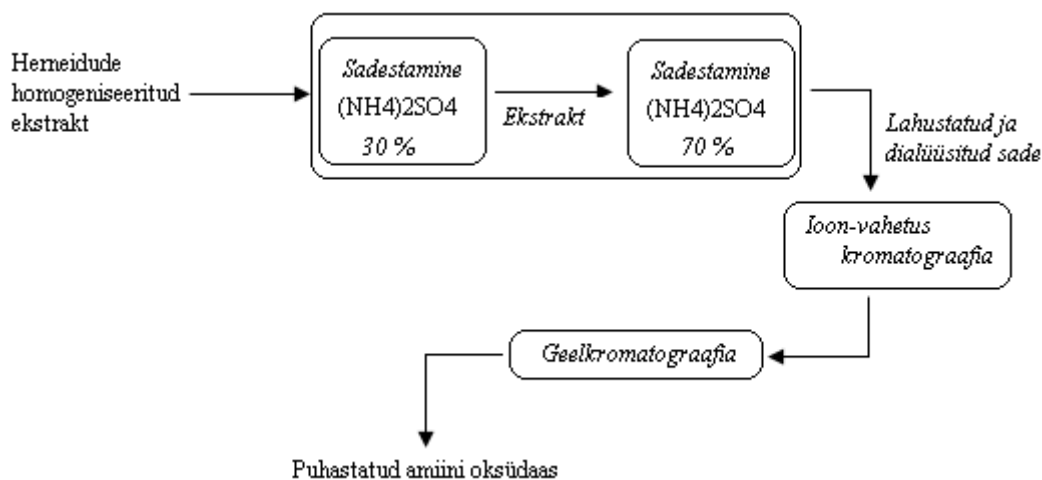
Reaktsiooni parameetrite arvutamiseks kasutati programme SigmaPlot® 9.0 (SPSS Software, USA) ning GraphPad Prism® 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

2.4 Amiini oksüdaasi eraldamine ja puhastamine

Herned (*Pisum sativum*) pesti 0,5 % KMnO₄ lahusega hallituste ja bakterite hävitamiseks, seejärel idandati pimedas toatemperatuuril. Kaheksa päeva vanused idud koguti ning homogeniseeriti uhmris. Ekstraktist eraldati tahked osakesed tsentrifuugimise teel 30 minuti jooksul 27 000 g juures. Seejärel lisati ekstraktile ammooniumsulfaati 30 %-ni küllastus kontsentratsioonist, segati magnetsegajal 30 minutit ning tsentrifuugiti uuesti 27 000 g juures 20 minutit. Sade eemaldati ja saadud ekstraktile lisati ammooniumsulfaati 70 %-lise küllastus kontsentratsioonini. Segu segati magnetsegajal 30 minutit ning tsentrifuugiti 27 000 g juures 20 minutit. Saadud sade lahustati külmas 0,1 M fosfaatpuhvril (pH = 7,00) ning dialüüsiiti 24 tunni jooksul 0,1 M fosfaatpuhvril (pH = 7,00).

Ensüümi edasiseks puhastamiseks süstiti dialüüsitud lahus DEAE-tselluloosiga täidetud kolonni (Ø = 2,5 cm, h = 20 cm) ning voolutati voolukiirusel 9 ml/h 0,02 M fosfaatpuhvriga (pH = 7,00), seejärel valgu eraldamiseks 0,1 M KCl lahusega 0,1 M fosfaatpuhvril. Proovid koguti 7 ml fraktsioonidena. Kogutud fraktsioonides määrati ensüümi aktiivsus amperomeetriselt ning ensüümi sisaldavad fraktsioonid viidi Sephadex G-200-ga täidetud kolonni (Ø = 1,5 cm, h = 53 cm), mida voolutati 0,02 M fosfaatpuhvriga (v = 9 ml/h). Proovid koguti 2 ml fraktsioonidena. Kogutud fraktsioonides määrati ensüümi aktiivsus.

Kogu puhastamine viidi läbi +4 °C juures ning pärast igat etappi määrati amiini oksüdaasi eriaktiivsus. Amiini oksüdaasi puhastamise skeem herneidudest on toodud joonisel 4.



Joonis 4. Amiini oksüdaasi puhastamise skeem.

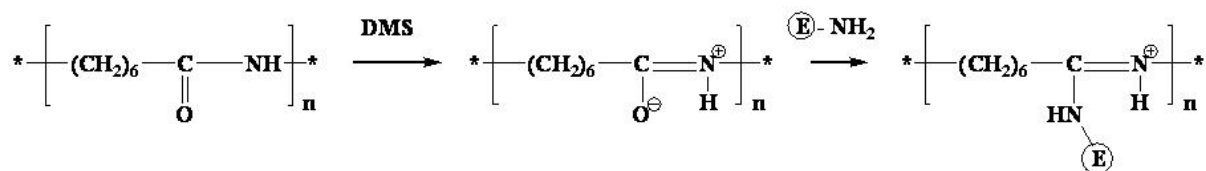
Sephadex G-200 täidetud kolonni kalibreerimiseks kasutati markerainetena dekstriinsinist ($M = 2\,000$ kDa), alkoholi oksüdaasi ($M = 600$ kDa), glükoosi oksüdaasi ($M = 158$ kDa), katalaasi ($M = 232$ kDa), BSA ($M = 66$ kDa) ja kaaliumdikromaati ($M = 294$ Da). Kalibreerimisgraafikut kasutati amiini oksüdaasi molekulmassi määramiseks.

2.5 Amiini oksüdaasi immobiliseerimine

Amiini oksüdaasi immobiliseerimiseks kasutati kandjana 80 cm pikkuseid nailonniite. Immobiliseeritud ensüümi hoiti +4 °C juures 0,1 M fosfaatpuhvrts (pH = 7,00).

2.5.1 Immobiliseerimine nailonile dimetüülsulfaadi abil

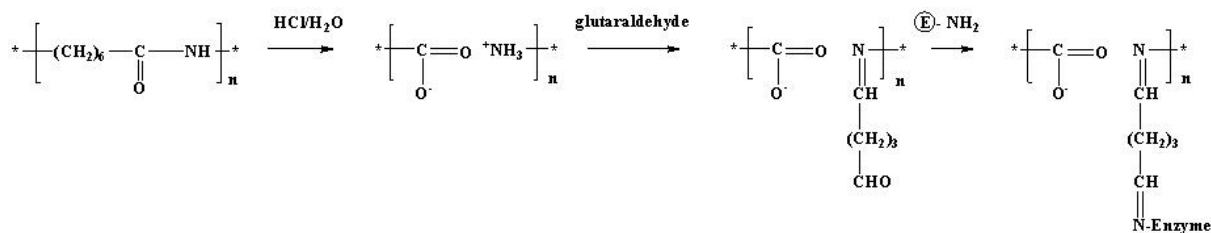
Nailoni aktiveerimiseks hoiti kandjat 2...5 minutit +60 °C juures dimetüülsulfaadis (DMS). DMS eemaldamiseks pesti kandjat korduvalt jääkülmas metanoolis ning seejärel jääkülmas 0,1 M fosfaatpuhvrts (pH = 7,00). Kandjat inkubeeriti 24 tunni jooksul +4 °C juures amiini oksüdaasi lahuses 0,1 M fosfaatpuhvrts (pH = 7,00). Sidumata jäänud ensüümi eraldamiseks pesti kandjat 0,1 M fosfaatpuhvrtsiga (pH = 7,00).



Joonis 5. Amiini oksüdaasi immobiliseerimine nailonile dimetüülsulfaadi abil.

2.5.2 Immobiliseerimine nailonile glutaaraldehüüdi abil

Amorfse nailoni eraldamiseks hoiti kandjat 5...20 minutit +50 °C juures 18,6 % CaCl₂ lahuses, mis oli eelnevalt valmistatud 18,6 % vesi-metanool segusse. Seejärel pesti kandjat 20 minuti vältel 0,1 M fosfaatpuhvriga (pH = 7,00). Nailoni pinna osaline hüdrolüüs viidi läbi +45 °C juures 3,6 M soolhappega, kusjuures hüdrolüüsi aega varieeriti 20...60 minutini. Pärast hüdrolüüsimist pesti kandjat 0,1 M fosfaatpuhvriga (pH = 7,00) ning hoiti 5...60 minutit toatemperatuuril 2,5...12,5 % glutaaraldehüüdi lahuses. Töötlemisele glutaaraldehüüdiga järgnes ensüümi sidumine: +4 °C juures inkubeeriti kandjat 24 tunni jooksul ensüümi lahuses, mis oli eelnevalt valmistatud 0,1 M fosfaatpuhvrisse (pH = 7,00). Sidumata jäänud ensüümi eraldamiseks pesti kandjat 0,1 M fosfaatpuhvriga (pH = 7,00).



Joonis 6. Amiini oksüdaasi immobiliseerimine nailonile glutaaraldehüüdi abil.

2.6 Amiinide biosensori valmistamine

Biosensori konstrueerimiseks kasutati Clarki'i tüüpi hapnikuandurit. Immobiliseeritud amiini oksüdaasi sisaldav nailonist niit, mille pikkus oli 80 cm, lisati reaktsiooni segusse, et vältida niidi kinnitamisest anduri pinnale tulenevatest täiendavatest difusioonilistest takistustest.

2.7 Biogeensete amiinide analüüs kala proovides

2.7.1 Proovide ettevalmistamine

Kadaveriini ja putrestsiini 0,02 M standardlahused valmistati 0,1 M fosfaatpuhvriss (pH 7,00).

Biogeensete amiinide sisaldust uuriti hõbeheigis sõltuvalt kalaproovi vanusest, kusjuures analüüsiti kokku kümmet proovi. Proove hoiti kahel erineval temperatuuril +4 °C ja toatemperatuuril. Proovide säilitamise aega varieeriti 1...10 päevani. Proove valmistati ette kahel meetodil.

Meetod nr. 1. Kalaproove kaaluti 2 g ning ekstraheeriti 5 ml 5 % trikloroäädikhappega (TCA). Proove segati ning jäeti 10 minutiks toatemperatuuril seisma. Seejärel tsentrifuugiti 10 minutit 5 000 g juures. Ekstrakt eemaldati ning kõikide proovide ruumalad viidi 6 ml-ni 5 % TCA-ga. Sellele järgnes ekstraheerimine 5 ml butanool / n-heptaan (1:1) lahuses.

Meetod nr. 2. Kalaproove kaaluti 3 g ning ekstraheeriti 4,5 ml 0,4 M perkloorhappega (PCA). Proovid asetati ultrahelivanni 10 minutiks. Sademe eraldamiseks tsentrifuugiti proove 10 minutit 5 000 g juures. Ekstrakt eemaldati ning kõikide proovide ruumalad võrdsustati 0,4 M PCA-ga. Sellele järgnes ekstraheerimine 5 ml butanool / n-heptaan (1:1) lahuses.

2.7.2 Proovide derivatiseerimine

200 µl analüüsitavale proovile (100 µl standardlahusele) lisati 20 µl 2M NaOH, 30 µl küllastatud NaHCO₃ lahust. Ennem 500 µl dansüülkloriidi lahuse (10 mg/ml atsetoonis) lisamist kontrolliti proovi pH. Seejärel proove segati ning jäeti 45 minutiks fooliumisse pakituna toatemperatuuril seisma. Reaktsioon peatati 10 µl 25 % NH₄OH lisamisega. Enne analüüsimist eraldati sade tsentrifuugimise teel ning kontrolliti pH.

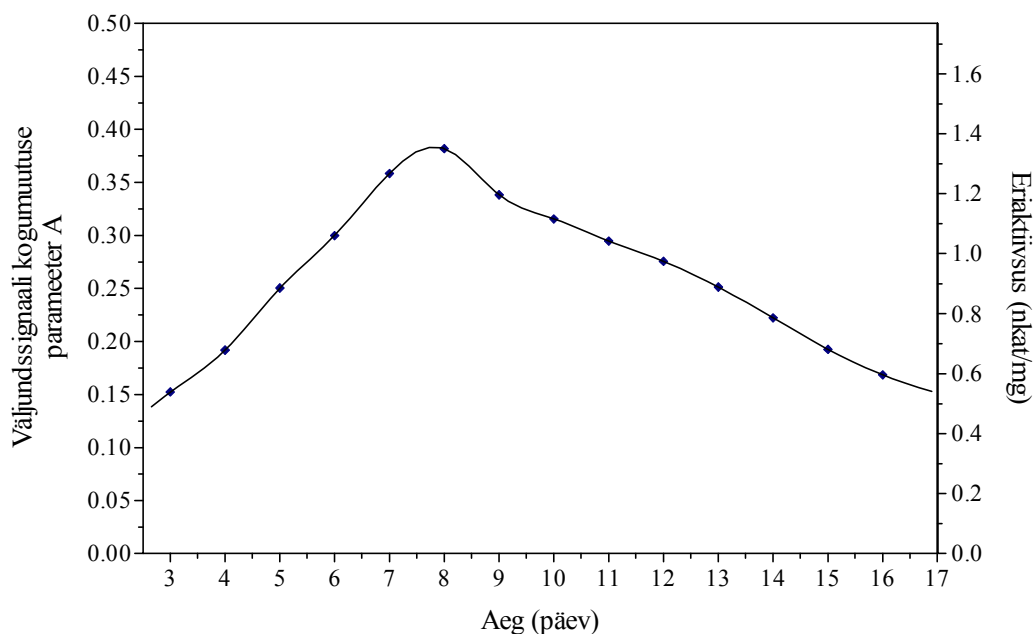
2.7.3 HPLC analüüsi tingimused

Solventidena kasutati A: MilliQ-vett ja B: atsetonitriili. Biogeensete amiinide eraldamiseks kasutati lineaarset gradienti, mis algas 50:50 A-B ning lõppes 30 minutil 10:90 A-B. Igale analüüsile järgnes 7 minutiline kolonni pesemine, mis oli vajalik esialgsete analüüsi tingimuste taastamiseks (A-B 50:50). Voolukiirus hoiti alati konstantne 1 ml/min. Detektorina kasutati flouresents- ja UV detektoreid. Analüüsitavat proovi süstiti 10 µl.

3 TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 Amiini oksüdaasi puhastamine ning puhastamisprotsessi efektiivsuse hindamine

Kirjanduse andmetel sõltub amiini oksüdaasi eriaktiivsus herneidudes nende kasvamise faasist. Maksimaalse eriaktiivsuse leidmiseks määrati ensüümi eriaktiivsus amperomeetriselt 3...16 päeva vanuste idude homogeniseeritud ekstraktis. Enne kolmandat päeva ei olnud märkimisväärset idude tekkimist märgata. Jooniselt 7 on toodud amiini oksüdaasi eriaktiivsuse muutus sõltuvalt idude vanusest. Eriaktiivsuse maksimum saavutati kaheksandal päeva, millele järgnes ensüümi eriaktiivsuse langus, mis võib olla seotud lehtede tekkega idudel. Saadud andmete põhjal kasutati edasised uurimistöös amiini oksüdaasi eraldamiseks kaheksa päeva vanuseid herneidusid, kusjuures alati kasutati ühe ja sama firma herneid.



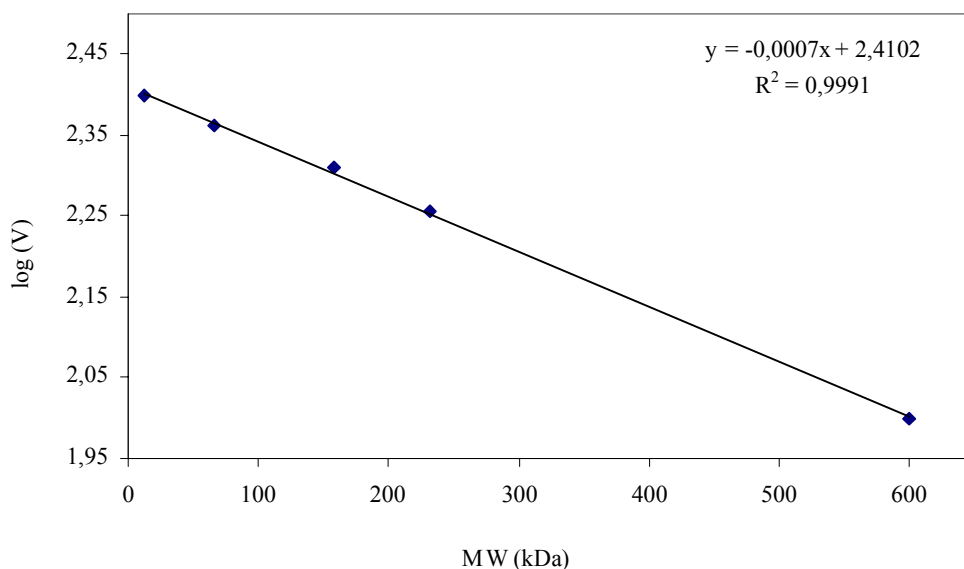
Joonis 7. Maksimaalse väljundssignaali muutuse (*parameeter A*) sõltuvus herneidude kasvamise ajast. Mõõtmised viidi läbi õhuhapnikuga küllastatud 0,1 M fosfaatpuhvris (pH 7,00) 25 °C juures; [1,5-diaminopentaan] = 0,15 mM, proovi süstiti 100 µl, reaktsiooninõu ruumala 38 ml.

Amiini oksüdaasi puhastamine herneidudest oli kolme etapiline. Algmaterjal esmalt homogeniseeriti, seejärel valk sadestati ning erinevad valgud eraldati erinevate kromatograafiliste meetodite abil. Amiini oksüdaasi eriaktiivsuse alusel hinnati erinevate puhastusetappide efektiivsust ning samuti ensüümi saagist. Selgus, et ensüümi puhastamise käigus oli kõige efektiivsem etapp sadestamine ammooniumsulfaadiga, mille käigus amiini oksüdaasi eriaktiivsus tõusis ligi 70 %. Saadud tulemused puhastamise efektiivsuse kohta eri etappidel on toodud tabelis 2. Ensüümi puhastamine tervikuna ei olnud väga efektiivne, eriaktiivsus suurenes vaid 2 korda, samal ajal kui kirjanduse andmetel on saadud eriaktiivsuse tõusuks isegi kuni 136 korda ^[32-35]. Puhastamise saagiseks saadi 51,8 %, mis on võrreldes kirjanduses leitud andmetega ^[32-35] väga hea tulemus. Puhastamisprotsessi efektiivsuse tõstmiseks on vaja modifitseerida kasutatud kromatograafilisi meetodeid – kasutada efektiivsemaid kolonnide täidiseid ning optimeerida kolonnide mõõtmeid.

Tabel 2. Herneidudest amiini oksüdaasi puhastamisprotsessi erietappide efektiivsuse hindamine erietappides. Kineetilised mõõtmised viidi läbi õhuhapnikuga aereeeritud 0,1 M fosfaatpuhvril (pH 7,00) 25 °C juures, [1,5-diaminopentaan] = 0,15 mM; proovi süstiti 100 µl, reaktsiooninõu ruumala 38 ml.

Fraktsioon	Kogu aktiivsus (nkat)	Eriaktiivsus (nkat/mg)	Saagis (%)
Algne ekstrakt (tsentrifuugitud)	1412,0	8,52	100
Sadestamine ammooniumsulfaadiga (30 %)	1326,0	8,68	93,9
Sadestamine ammooniumsulfaadiga (70 %)	1146,6	12,5	81,2
Ioon-vahetuskromatograafia	808,9	13,4	57,3
Geelkromatograafia	732,0	13,9	51,8

Puhastatud amiini oksüdaasi molekulmassi määramiseks kasutati geelkromatograafiat. Sephadex G-200 täidetud kolonni kalibreeriti ning markerainetena olid kasutusel dekstriinsinist (M = 2 000 kDa), alkoholi oksüdaasi (EC 1.1.3.13, M = 600 kDa), glükoosi oksüdaasi (EC 1.1.3.4, M = 158 kDa), katalaasi (EC 1.11.1.6, M = 232 kDa), albumiini (M = 66 kDa) ja kaaliumdikromaati (M = 294 Da). Molekulmassi määramiseks saadi lineaarne kalibreerimisgraafik, mis on toodud joonisel 8. Kalibreerimisgraafiku abil määrati puhastatud amiini oksüdaasi molekulmassiks $184 \pm 2,6$ kDa, mis langeb hästi kokku kirjanduses toodud andmetega ^[33,35,36].



Joonis 8. Kalibreerimisgraafik molekulmassi määramiseks. Sephadex G-200 kolonn, voolukiirus 6 ml/h, detekteerimine neeldumise järgi $\lambda = 280$ nm.

3.2 Ensüümi katalüütiliste omaduste uurimine amperomeetriliselt

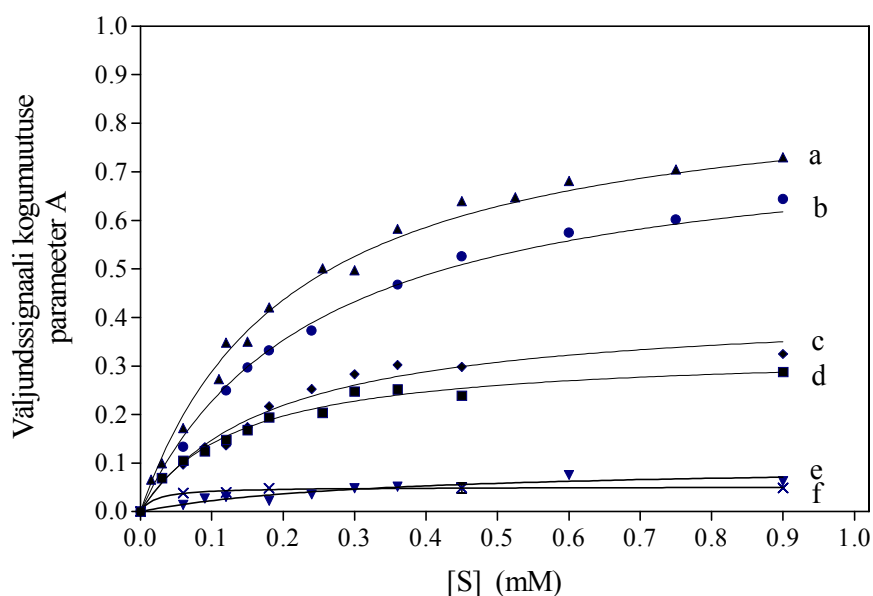
Herneidudest eraldatud amiini oksüdaasi aktiivsus määrati amperomeetriliselt erinevate amiinide suhtes, mille struktuurvalemid on toodud tabelis 4. Reaktsiooni kineetika jälgimiseks kasutati Clark'i tüüpi hapnikuandurit, mille abil mõõdeti hapniku kontsentratsiooni vähenemist reaktsioonikeskkonnas ensüümi poolt katalüüsitava reaktsiooni käigus.

Tabel 4. Substraadid, mille suhtes määrati amiini oksüdaasi eriaktiivsus.

Substraadid	Struktuurid
1,2-diaminoetaan	<chem>NCCN</chem>
1,3-diaminopropaan	<chem>NCCCN</chem>
1,4-diaminobutaan (putrestsiin)	<chem>NCCCCN</chem>
1,5-diaminopentaan (kadaveriin)	<chem>NCCCCCN</chem>

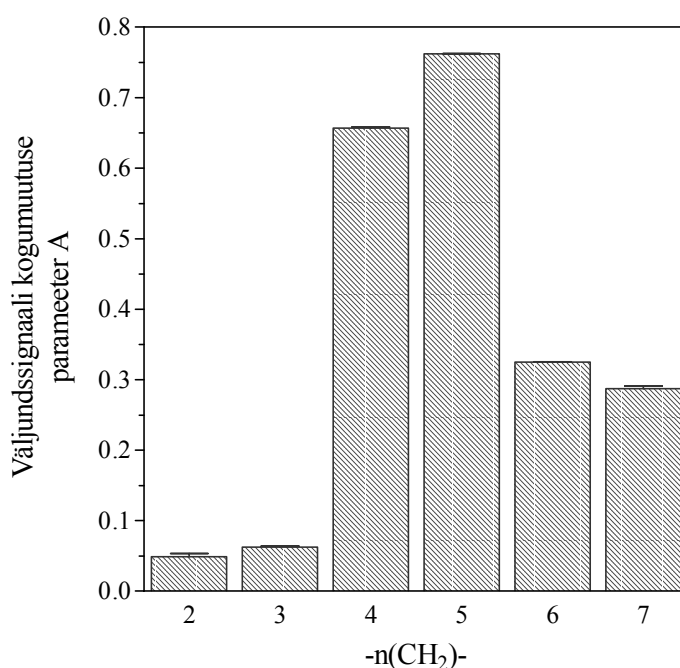
1,6-diaminoheksaan	<chem>NCCCCC[NH2]</chem>
1,7-diaminoheptaan	<chem>NCCCCC[NH2]</chem>
histamiin	<chem>Nc1ccc(N)nn1</chem>
dopamiin	<chem>NCCc1ccc(O)c(O)c1</chem>
1-aminobutaan	<chem>NCCC</chem>

Amiini oksüdaasi eriaktiivsust erinevate amiinide suhtes iseloomustati sensori signaali kogumuutuse parameetri A alusel, mis arvutati biosensori dünaamilise mudeli alusel [54,55]. Väljundsignaali kogumuutuse parameetri sõltuvus erinevate alifaatsete diamiinide kontsentratsioonist on toodud joonisel 9.



Joonis 9. Maksimaalse signaali muutuse (*parameeter A*) sõltuvus substraadi kontsentratsioonist: (a) 1,5-diaminopentaan; (b) 1,4-diaminobutaan; (c) 1,6-diaminoheksaan; (d) 1,7-diaminoheptaan; (e) 1,3-diaminopropan; (f) 1,2-diaminoetaan. Kineetika mõõtmised viidi läbi õhuhapnikuga aereeritud 0,1 M fosfaatpuhvris (pH 7,00) 25° C juures.

Selgus, et sobivaimaks substraadiks ensüümi puhastusprotsessi efektiivsuse hindamisel oleks 1,5-diaminopentaani (kadaveriin), sest juba väikestel substraadi kontsentratsioonidel saadi märkimisväärne väljundsignaali muutus. Amiini oksüdaasi aktiivsus sõltub oluliselt metüleenrühmade arvust alifaatsete diamiinide reas (joonis 10), mis viitab amiini oksüdaasi aktiivtsentri suurele spetsiifilisusele ja kõrgele tundlikkusele molekuli mõõtmete suhtes.



Joonis 10. Maksimaalse signaali muutuse (*parameeter A*) sõltuvus metüleenrühmade arvust alifaatsete diamiinide reas: 1,2-diaminoetaan; 1,3-diaminopropaan; 1,4-diaminobutaan; 1,5-diaminopentaan; 1,6-diaminoheksaan; 1,7-diaminoheptaan. Mõõtmised viidi läbi õhuhapnikuga küllastatud 0,1 M fosfaatpuhvris (pH 7,00) 25° C juures.

Kasutades standardina amiini oksüdaasi eriaktiivsust 1,5-diaminopentaani suhtes (100 %), arvutati maksimaalse väljundsignaali muutuse (*parameeter A*) alusel välja suhtelised eriaktiivsused ka teiste substraatide jaoks (tabel 5). Ensüümi suhteline eriaktiivsus aromaatsete amiinide - dopamiini ja histamiini suhtes võrreldes 1,5-diaminopentaaniga oli ligikaudu 10 %, ehkki kirjanduse andmetel on nende substraatide suhtes saadud küllaltki kõrgeid aktiivsusi ^[28,38].

Võrreldes ensüümi eriaktiivsust ühesuguste mõõtmetega, kuid erinevat arvu aminorühmi sisaldavate molekulide suhtes, näiteks 1-aminobutaani ja 1,4-diaminobutaani korral, leiti, et eriaktiivsused erinesid ligi 10 korda. Selle põhjuseks võivad olla substraadi sidumisprotsessi

käigus toimuvad keemilised interaktsioonid, mis võimaldavad mitut aminorühma sisaldavate molekulide spetsiifilist äratundmist ja amiini oksüdaasi suuremat eriaktiivsust nende suhtes.

Parameetri A väärtustel alusel leiti valemite v_2 ja v_3 abil ka K_s väärtused erinevate amiinsete substraatide jaoks (tabel 5).

Tabel 5. Amiini oksüdaasi suhtelised eriaktiivsused ja K_s väärtused erinevatele amiinidele.

Substraadid	Eriaktiivsus (%)*	K_s (mM)
1,2-diaminoetaan	6,4	$0,022 \pm 0,007$
1,3-diaminopropaan	8,2	$0,368 \pm 0,143$
1,4-diaminobutaan (putrestsiin)	86,2	$1,150 \pm 0,161$
1,5-diaminopentaan (kadaveriin)	100,0	$1,919 \pm 0,421$
1,6-diaminoheksaan	42,6	$0,321 \pm 0,067$
1,7-diaminoheptaan	37,7	$0,204 \pm 0,026$
histamiin	9,8	$0,052 \pm 0,015$
dopamiin	11,6	$0,032 \pm 0,001$
1-aminobutaan	9,8	$0,159 \pm 0,064$

* Amiini oksüdaasi suhtelised eriaktiivsused kõige efektiivsema substraadi kadaveriini suhtes %-des.

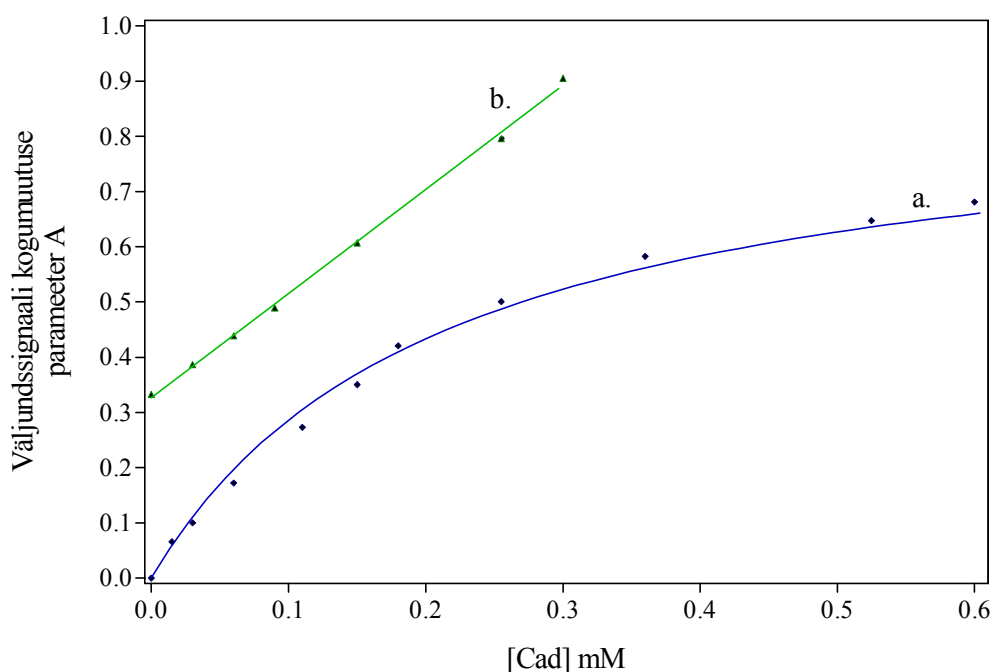
Nagu tulemustest selgus, sobib herneidudest eraldatud amiini oksüdaas väga hästi biosensori bioelektiivseks elemendiks just kadaveriini ja putrestsiini määramiseks. Need kaks on olulisemad biogeensed amiinid, mis tekivad toiduainete roiskumis- ja käärimisprotsessi tulemusena ning mille sisalduse alusel saab hinnata toiduainete kvaliteeti. K_s väärtuseks 1,5-diaminopentaani ja 1,4-diaminobutaani jaoks saadi vastavalt $1,919 \pm 0,421$ ja $1,150 \pm 0,161$ mM.

3.2.1 Biogeensete amiinide koosmõju

Tavaliselt on määratavates proovides üheaegselt mitmeid erinevaid biogeenseid amiine. Seepärast uuriti putrestsiini ja kadaveriini koosmõju biosensori väljundsignaalile ja selle iseloomulikele parameetritele. Viidi läbi esialgsed mõõtmised, kus ühe substraadi (putrestsiini

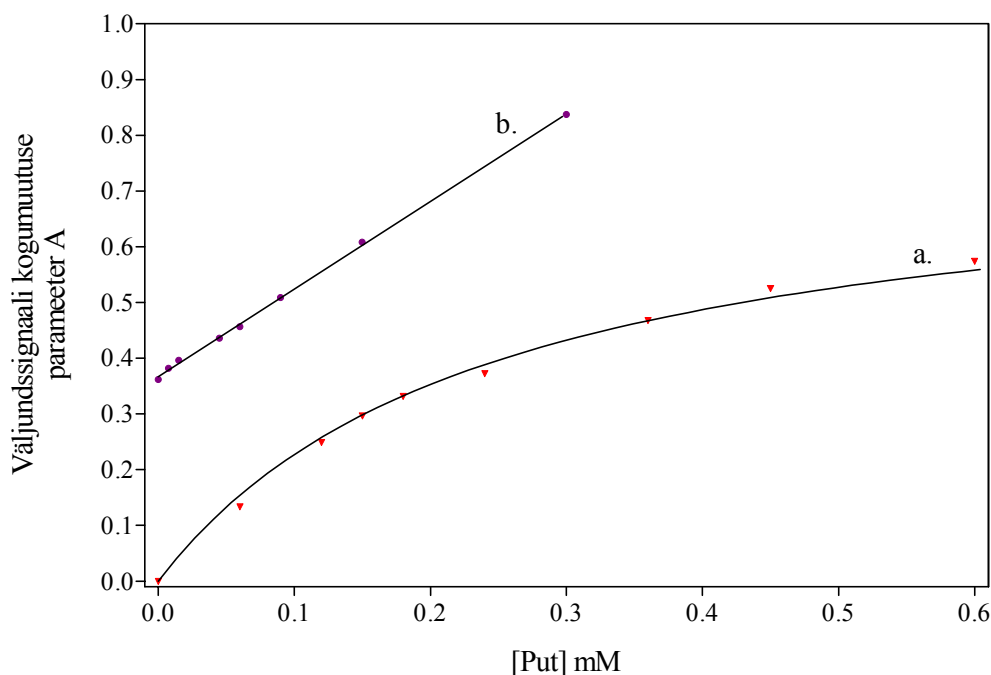
või kadaveriini) kontsentratsioon oli konstantne ning teise substraadi kontsentratsiooni varieeriti.

Kadaveriini kontsentratsiooni mõju signaali kogumuutuse parameetritele võrreldi putrestsiini kontsentratsioonidel 0 ja 0,15 mM (joonis 11). Nagu jooniselt näha, ei ole nende substraatide mõju reaktsiooni parameetritele päris aditiivne, sest nii madalatel (alla 0,05 mM) kui ka kõrgematel (üle 0,2 mM) kadaveriini kontsentratsioonidel on putrestsiinist tingitud signaali muutus suurem kui keskmistel kadaveriini kontsentratsioonidel.



Joonis 11. Väljundsignaali kogumuutuse sõltuvus kadaveriini kontsentratsioonist erinevatel putrestsiini kontsentratsioonidel: (a) [putrestsiin] = 0 mM; (b) [putrestsiin] = 0,15 mM, $r^2 = 0,9985$.

Samasugust nähtust võis täheldada ka signaali kogumuutuse parameetri sõltuvusel putrestsiini kontsentratsioonist, kui kadaveriini kontsentratsioon lahuses oli fikseeritud (joonis 12).



Joonis 12. Väljundsignaali kogumuutuse sõltuvus putrestsiini kontsentratsioonist erinevatel kadaveriini kontsentratsioonidel: (a) [kadaveriin] = 0 mM; (b) [kadaveriin] = 0,15 mM, $r^2 = 0,9993$.

Samas on koosmõju efekt näiteks substraatide kontsentratsioonidel 0,15 mM ($A = 0,61$) väiksem kui mõlema substraadi poolt eraldi samal kontsentratsioonil põhjustatud "puhaste" efektide summa ($A = 0,68$). Kuna erinevates kala (ja teiste toiduainete) proovides on nende substraatide suhted küllaltki erinevad, siis biosensori kalibreerimiseks ja praktiliseks kasutamiseks tuleks edaspidi põhjalikumalt uurida konkreetsetes toiduainete proovides leiduvate biogeensete amiinide koosmõju biosensori väljundsignaali parameetritele.

3.3 Amiini oksüdaasi immobiliseerimine

3.3.1 Amiini oksüdaasi immobiliseerimine nailonile dimetüülsulfaadi abil

Nailoni pinnal on üksikud vabad reaktsioonitsentrid, mida saab kasutada kovalentseks ensüümi sidumiseks. Üheks võimaluseks reaktsioonitsentrite arvu suurendamiseks on nailoni pinna alküülimine dimetüülsulfaadi (DMS) abil. Kuna DMS-ga töötlemine mõjutab oluliselt nailoni mehhaanilisi omadusi, määrati esmalt kandja pinna aktiveerimise optimaalne aeg. Optimaalseks aktiveerimise ajaks osutus kolm minutit. Aktiveerimisaja pikendamisel muutus

nailon rabadaks ja raskesti töödeldavaks, lühema aja jooksul ei saadud ensüümi immobiliseerimiseks piisavalt aktiivset pinda.

Mõõtmiste käigus toimus immobiliseeritud ensüümi kiire aktiivsuse langus, mis sõltus eksponentsiaalselt niidi kasutamise arvust, mis viitab sellele, et ensüüm ei ole kandjale seostunud kovalentselt ning mõõtmiste käigus toimub selle mahapesemine. Peale esimest kasutamist langes DMS abil immobiliseeritud ensüümi aktiivsus 34 % võrra ning peale kuuendat järjestikku tehtud mõõtmist oli ensüümi aktiivsus võrreldes esimese mõõtmisega langenud juba 75 %. Seega võib öelda, et DMS abil stabiilset immobiliseeritud amiini oksüdaasi ei saadud ning seda immobiliseerimise meetodit ei kasutatud biosensori bioselektiivsete elementide valmistamiseks.

3.3.2 Amiini oksüdaasi immobiliseerimine nailonile glutaaraldehüüdi abil

Potentsiaalsete reaktsioonitsentrite arvu suurendamiseks kasutati nailoni pinna osalist hüdrolüüsi. Selle käigus aktiveeritakse amino- ja karboksüülrühmad, mida oleks võimalik kasutada edaspidiseks ensüümi sidumiseks. Mida rohkem on kandjapinnal vabasid karboksüülrühmi, seda enam leidub ka vabu aminorühmi, mis on võimelised reageerima glutaaraldehüüdiga. Toetudes varasematele uurimustele tuleks nailoni pinna osalist happelist hüdrolüüsi viia läbi pehmetes tingimustes, liiga kõrge happe kontsentratsiooni ja/või temperatuur ning liiga pikk aktivatsiooniaeg võivad põhjustada nailoni mehhaaniliste omaduste muutumise: nailon muutub rabadaks ja kergesti purunevaks. Käesolevas töös viidi hüdrolüüs läbi 3,6 M soolhappega 45 °C juures ning optimaalseks ajaks osutus 40 minutit.

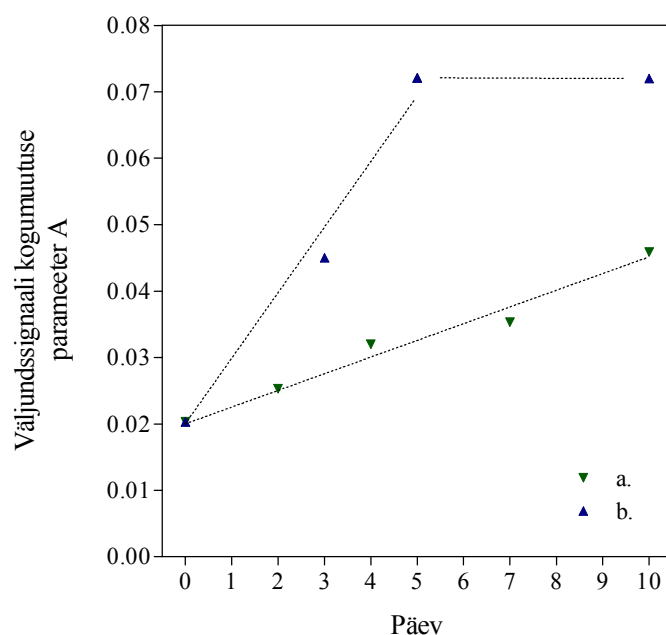
Aktiveeritud nailoni pinnale seoti esmalt glutaaraldehüüd, mis oli linkeriks ensüümi ja kandja vahel. Glutaaraldehüüdi kontsentratsiooni varieeriti vahemikus 2,5...12,5 %. Selgus, et glutaaraldehüüdi kontsentratsioon ei mõjuta oluliselt immobiliseeritud ensüümi aktiivsust ning edaspidi kasutati amiini oksüdaasi immobiliseerimiseks 5 % glutaaraldehüüdi lahust. Nailoni pinna aktiivsete rühmade olemasolu tõestamiseks töödeldi aktiveeritud niite ninhüdriini lahusega. Leiti, et nailon muutus kuumutades tumekollaseks, mis viitas vabade aminorühmade olemasolule aktiveeritud nailoni pinnal.

Immobiliseeritud ensüümi stabiilsust ajas uuriti 0,1 M fosfaatpuhvrts +4° C juures. Selgus, et glutaaraldehüüdiga immobiliseeritud ensüüm oli ajas stabiilne, kusjuures tema aktiivsus ei vähenenud kuu aja jooksul üle 5 %. Samuti uuriti immobiliseeritud ensüümi aktiivsuse muutumist sõltuvalt selle kasutamise kordade arvust mõõtmistel. Glutaaraldehüüdi abil

nylonile immobiliseeritud ensüümi aktiivsus ei muutunud paraleelkatsete käigus (tehti 4 paralleelset mõõtmist).

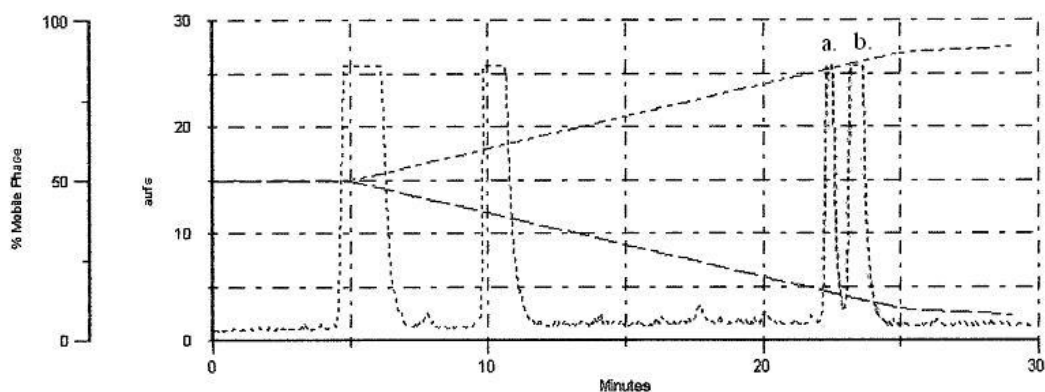
3.4 Biogeensete amiinide kontsentratsiooni määramine kalas biosensoriga ja HPLC meetodil

Kala (hõbeheik) proovides määrati biogeensete amiinide olemasolu biosensori abil. Kalaproovide ettevalmistamiseks kasutati kahte erinevat meetodit. Meetodi nr. 1 korral kasutati trikloriäädikhapet ning meetodi nr. 2 korral perkloorhapet. Kui meetodi nr. 1 korral lasti kalaproovidel lihtsalt seista solvendis, siis meetodi nr. 2 korral kasutati ultrahelivanni. Sensoriga on võimalik detekteerida hapniku kontsentratsiooni vähenemine reaktsioonikeskkonnas, kusjuures saadud signaali kogumuutuse parameeter sõltus kalaproovide vanusest ning summaarne biogeensete amiinide kontsentratsioon kasvas proovide säilitamisel 0...10 päeva jooksul. Seejuures suurenes toatemperatuuril hoiutud proovides amiinide kontsentratsioon oluliselt kiiremini kui +4° C juures hoiutud proovides. Saadud tulemused meetodi nr. 2 korral on toodud joonisel 13. Proovide ettevalmistamiseks meetodit nr. 1 kasutades saadi biosensori abil mõõdetav signaal oluliselt suuremate proovikoguste korral. Saadud tulemuste alusel ei saa teha järeldusi konkreetse biogeense amiini olemasolu kohta..



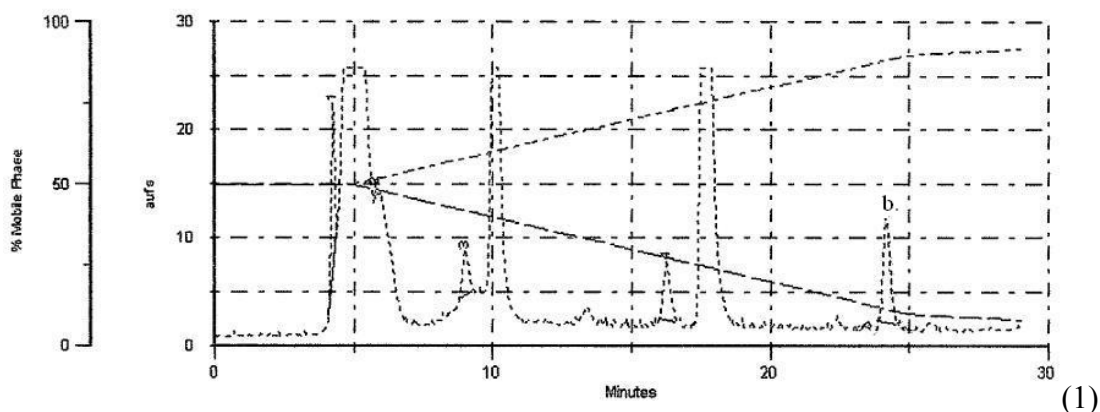
Joonis 13. Väljundsignaali kogumuutuse parameetri sõltuvus kala proovide vanusest. Kala proove hoiti (a) toatemperatuuril; (b) +4 °C juures. Mõõtmised viidi läbi õhuhapnikuga aereeritud 0,1 M fosfaatpuhvrts (pH 7,00) 25° C juures.

Samades kala proovides määrati biogeensete amiinide sisaldust ka kromatograafiliselt HPLC abil. Putrestsiini ja kadaveriini standardlahuste retensiooniaegadeks saadi vastavalt 23,5 ja 22,4 minutit. Standardlahuste kromatogrammid on toodud joonisel 14, kusjuures on näha, et kasutatud tingimustel on nende lahutamine piisav.

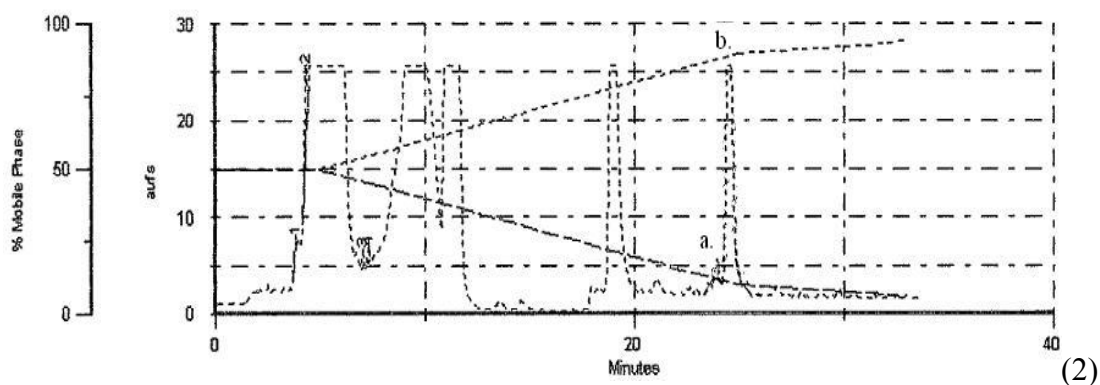


Joonis 14. HPLC kromatogramm standardilahuste (a) putrestsiini ja (b) kadaveriini jaoks.

HPLC meetodil analüüsiti toatemperatuuril 0...10 päeva hoitud kalaproove. Näitena on toodud toatemperatuuril hoitud kalaproovide kromatogrammid (joonis 15). Selgus, et värskes kalas putrestsiin puudub, kuid seal leidub madalates kontsentratsioonides kadaveriini. Maksimaalne kadaveriini kontsentratsioon saadi viie päeva vanuses proovis. Selgus ka, et kümnendaks päevaks oli kadaveriini kontsentratsioon mõnevõrra vähenenud, kuid putrestsiini oma samas mõnevõrra kasvanud. Üldiselt esines kalaproovides putrestsiini suhteliselt vähe. Saadud tulemused annavad hea aluse biosensori kalibreerimiseks biogeensete amiinide määramiseks.



(1)



Joonis 15. Erinevate kalaproovide HPLC kromatogrammid biogeensete amiinide (a) putrestsiini ning (b) kadaveriini sisalduse määramiseks. Kalaproove hoiti toatemperatuuril (1) 0 päeva, (2) 10 päeva.

Kümne päeva vanuse kalaproovi kromatogrammil (joonis 15, 2) on piigid kahe minuti võrra nihkunud paremale, põhjuseks on vastava proovi mõnevõrra kõrgem pH väärtus võrreldes teiste proovidega. Kuid kui kromatogrammid asetada üksteise peale ja võtta arvesse vastav nihe, siis piikide retensiooniajad kattuvad.

3.5 Eksperimendi edasine planeerimine

Läbiviidud eksperimentaalne töö on aluseks biogeensete amiinide biosensori konstrueerimiseks ja kasutamiseks kalaproovide värskuse hindamiseks putrestsiini ja kadaveriini sisalduse põhjal. Töös kasutati biosensori bioselektiivse elemendina herneidudest eraldatud amiini oksüdaasi, mis on selektiivne eelpoolnimetatud diamiinide suhtes ja võimaldab nende ühendite määramist. Amiini oksüdaasi immobiliseerimisel nailonkandjale saadi küll aktiivne ensüüm, kuid selle eriaktiivsus kandja ühiku kohta ei ole piisav praktikas kasutatava sensori konstrueerimiseks ning edaspidi oleks vaja uurida võimalusi ensüümi immobiliseerimise efektiivsuse tõstmiseks, mis omakorda eeldab ensüümi puhastamise efektiivsuse suurendamist ning kontsentreeritumate lahuste kasutamist immobiliseerimisel.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida võimalusi biogeensete amiinide biosensori konstrueerimiseks, kasutades biosensori bioselektiivse elemendina herneidudest eraldatud amiini oksüdaasi (EC 1.4.3.6).

Töö koosnes viiest etapist: amiini oksüdaasi eraldamine herneidudest, solubiliseeritud ensüümi katalüütiliste omaduste uurimine erinevate amiinide ning amiinide segude suhtes, ensüümi immobiliseerimine nailonist kandjale ning kalaproovides biogeensete amiinide määramine solubiliseeritud ensüümi abil.

Töös uuriti herneidudest amiini oksüdaasi eraldamist ning hinnati puhastamisprotsessi efektiivsust. Puhastamise saagiseks saadi 51,8 %, mis on võrreldes kirjandusest leitavate andmetega väga hea tulemus. Puhastamiseks kasutatud kromatograafiliste meetodite korral ensüümi eriaktiivsus aga ei suurenenud märgatavalt. Puhastusprotsessi efektiivsuse tõstmiseks oleks vaja kasutatud kromatograafilisi meetodeid mõnevõrra modifitseerida – kasutada efektiivsemaid täidiseid, optimeerida kolonnide mõõtmeid ning muuta voolutitena kasutatud lahuseid.

Puhastatud amiini oksüdaasi katalüütilisi omadusi iseloomustati amperomeetriliselt Clark'i tüüpi hapnikuanduri abil alifaatsete di-, monoamiinide ning aromaatsete amiinide suhtes. Tulemustest selgus, et herneidudest puhastatud amiini oksüdaasi eriaktiivsus sõltub oluliselt metüleenrühmade arvust alifaatsete diamiinide reas. Kõrged eriaktiivsuse väärtused saadi 1,5-diaminopentaani (kadaveriini) ja 1,4-diaminobutaani (putrestsiini) korral, need on peamised biogeensed amiinid, mis tekivad toidus roiskumis- ja käärimisprotsessi tulemusena. Uuriti ka kadaveriini ja putrestsiini koosmõju biosensori väljundsignaalile, millest selgus, et substraatide mõju reaktsiooni parameetritele ei ole aditiivne.

Eraldatud amiini oksüdaasi kasutamiseks biosensori bioselektiivse elemendina immobiliseeriti ensüüm erinevaid meetodeid kasutades niidikujulisele nailonkandjale, reagentidena kasutati dimetüülsulfaati ja glutaaraldehüüdi. Tulemustest selgus, et stabiilne immobilisatsioon saadi vaid glutaaraldehüüdiga immobiliseerides.

Solubiliseeritud ensüümi kasutati biogeensete amiinide määramiseks kala proovides ning saadud mõõtetulemusi võrreldi kõrgeefektiivse vedelikkromatograafia andmetega.

Leiti, et herneidudest eraldatud ensüüm sobib kasutamiseks biosensoris bioselektiivse elemendina biogeensete amiinide määramiseks ning kala värskuse hindamiseks.

SUMMARY

Construction of a biosensor for biogenic amines

The aim of the present work was to analyze the applicability of a simple and rapid method for the determination of biogenic amines. For that purpose amine oxidase (EC 1.4.3.6) from pea seedlings (*Pisum sativum*) was immobilized onto a nylon carrier and was used in a biosensor as a bioactive element.

The study consisted of five steps: the separation of amine oxidase from pea seedlings; characterization of the catalytic properties of solubilized enzyme towards different amines and amine mixtures; use of the solubilized enzyme to detect biogenic amines in fish samples; and immobilization of the purified enzyme onto nylon carrier.

The purification of amine oxidase from pea seedlings was studied and evaluated. Enzyme purification yield was 51.8 %, which is highest yield compared with earlier studies in this field. However, specific activity of the enzyme did not increase significantly during the chromatographic purification and further studies should be carried out to increase the efficiency of this method. The efficiency of purification process could be raised if more effective column packings were used, if the column measures and the choice of eluents were optimised.

Clark type oxygen sensor was used to characterize the purified amine oxidase catalytical properties towards aliphatic di- and monoamines, but also aromatic amines. It was shown that the specific activity of amine oxidase purified from pea seedlings depends significantly from the number methylene groups in aliphatic diamines. High specific activities were obtained with 1,5-diaminopentane (cadaverine) and 1,4-diaminobutane (putrescine), which are the two major biogenic amines produced in putrefaction and brewing processes. We also studied the combined effect of cadaverine and putrescine on biosensor signal parameters and found that their effects were not additive.

Immobilization of the purified enzyme onto a nylon carrier was studied by using two reagents: dimethyl sulphate and glutaraldehyde. Experiments showed that stable immobilization was only achieved by immobilizing with glutaraldehyde.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin kõigepealt tänada oma juhendajat Toonika Rinkenit, kellela selle töö valmimine poleks võimalik olnud.

Suured tänud ka TÜ Orgaanilise- ja Bioorgaanilise Keemia Instituudi labori 152 rahvale, eriti aga Laura Hermile, kes on alati olnud nõus oma teadmisi ja nõuandeid jagama. Tänud ka Gerda Raidarule, kes oli suureks abil HPLC analüüside tegemisel.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Önal,A. A review: Curent analytical methods for the determination of biogenic amines in food. *Food Chem.*, 2007, **103**, 1475-1486.
2. Mah,J.-H., Han,H.-K., Oh,Y.-J., Kim,M.-G., Hwang,H.-J. Biogenic amines in Jeotkals, Korean salted and fermented fish products. *Food Chem.*, 2002, **79**, 239-243.
3. Alberto,M.R., Arena,M.E., Nadra,M.C.M. A comparative survey of two analytical methods for identification and quantification of biogenic amines. *Food Control*, 2002, **13**, 125-129.
4. Chiacchierini,E., Restuccia,D., Vinci,G. Evaluation of two different extraction methods for chromatographic determination of bioactive amines in tomato products. *Talanta*, 2006, **69**, 548-555.
5. Shakila,R.J., Vasundhara,T.S., Kumudavally,K.V. A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. *Food Chem.*, 2001, **75**, 255-259.
6. Wimmerova,M., Macholan,L. Sensitive amperometric biosensor for the determination of biogenic and synthetic amines using pea seedlings amine oxidase: a novel approach for enzyme immobilisation. *Biosen. Bioelectron.*, 1999, **14**, 695-702.
7. Bouvrette,P., Male,K.B., Luong,J.H.T., Gibbs,B.F. Amperometric biosensor for diamine using diamine oxidase purified from porcine kidney. *Enzyme Microb. Technol.*, 1997, **20**, 32-38.
8. Frébort,I., Skoupa,L., Peč,P. Amine oxidase-based flow biosensor for the assessment of fish freshness. *Food Control*, 2000, **11**, 13-18.
9. Wijesuriya,D., Rechnitz,G.A. Mixed carbon paste-pea seedling electrochemical sensor for measuring plant growth-regulating activity of amines. *Anal. Chim. Acta*, 1991, **243**, 1-8.
10. Tombelli,S., Mascini,M. Electrochemical biosensors for biogenic amines: a comparison between different approaches. *Anal. Chim. Acta*, 1998, **358**, 277-284.
11. Niculescu,M., Frébort,I., Pec,P., Galuszka,P., Mattiasson,B., Csöregi,E. Amine oxidase based amperometric biosensor for histamine detection. *Electroanalysis*, 2000, **12**, 369-375.

12. Draisci,R., Volpe,G., Lucentini,L., Cecilia,A., Federico,R., Palleschi,G. Determination of biogenic amines with an electrochemical biosensor and its application to salted anchovies. *Food Chem.*, 1998, **62**, 225-232.
13. Gasparini,R., Scarpa,M., Vianello,F., Mondovi,B., Rigo,A. Renewable miniature enzyme-based sensing devices. *Anal. Chim. Acta*, 1994, **294**, 299-304.
14. Gasparini,R., Scarpa,M., Paolo,M.L., Stevanato,R., Rigo,A. Amino oxidase amperometric biosensor for polyamines. *Biochem. Bioenerg.*, 1991, **25**, 307-315.
15. Chemnitius,G.C., Bilitewski,U. Development of screen-printed enzyme electrodes for the estimation of fish quality. *Sens. Actuators, B*, 1996, **32**, 107-113.
16. Eggins,B.R. Biosensors: an introduction., Wiley Teubner "Chemistry", 1996.
17. Sharma,A., Rogers,K.R. Biosensors. *Meas. Sci. Technol.*, 1994, **5**, 461-472.
18. Prof. Turner, A.P.F. Biosensors: past, present and future. Cranfield University, 1996.
19. <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>
20. Jalkanen,S., Salvi,M. Cell surface monoamine oxidases: enzymes in search of a function. *EMBO J.*, 2001, **20**, 3893-3901.
21. Toninello,A., Pietrangeli,P., De Marchi,U., Salvi,M., Mondov,B. Amine oxidases in apoptosis and cancer. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer*, 2006, **1765**, 1-13.
22. Morpurgo,L. Amine Oxidase: structure and function of copper-containing amine oxidases. *Inflammation Res.*, 2001, **50**, S126-127.
23. Floris,G., Finazzi,A. Amine Oxidases. *Encyclopedia Biol. Chem.*, 2004, **1**, 85-89.
24. Yagodina,O.V., Nikol'skaya,E.B., Khovanskikh,A.E., Kormilitsyn,B.N. Amine oxidases of microorganisms. *Evol. Biochem. Physiol.*, 2002, **38**, 251-258.
25. Smith,T.A. Amines in plants. *Phytochemistry*, 1988, **27**, 1233-1234.
26. Brazeau,B.J., Johnson,B.J., Wilmot,C.M. Copper-containing amine oxidases. Biogenesis and catalysis; a structural perspective. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004, **428**, 22-31.
27. McGuirl,A.M., Dooley,M.D. Copper-containing oxidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1999, **3**, 138-144.
28. Medda,R., Padiglia,A., Floris,G. Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry*, 1995, **39**, 1-9.
29. Buffoni,F., Ignesti,G. The copper-containing amine oxidases: Biochemical aspects and functional role. *Mol. Genet. Metab.*, 2000, **71**, 559-564.
30. Cona,A., Rea,G., Angelini,R., Federico,R., Tavaladoraki,P. Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci.*, 2006, **1**, 80-88.

31. Šebela,M., Frébort,I., Lemr,K., Brauner,F., Peč,P. A Study on the reactions of plant copper amine oxidase with C3 and C4 aliphatic diamines. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, **384**, 88-99.
32. Vianello,F., Malek-Mirzayans,A., Paolo,M.L., Rigo,A. Purification and characterization of amine oxidase from pea seedlings. *Protein Expression Purif.*, 1999, **15**, 196-201.
33. McGowan,R.E., Muir,R.M. Purification and properties of amine oxidase from epicotyls of *Pisum sativum*. *Plant Physiol.*, 1971, **47**, 644-648.
34. Mann,P.J.G. Further purification and propertis of the amine oxidase of pea seedlings. *Biochem. J.*, 1961, **79**, 623-631.
35. Werle,E., Raub,A. Occurrence, formation and destruction of biogenous amines in plants with special reference to histamine. *Biochemische Zeitschrift*, 1948, **318**, 538-553.
36. McGuirl,M.A., McCahon,C.D., McKeown,K.A., Dooley,D.M. Purification and characterization of pea seedling amine oxidase for crystallization studies. *Plant Physiol.*, 1994, **106**, 1205-1211.
37. Kuznetsov,V., Radykina,N.L., Shevyakova,N.I. Polyamines and stress: Biological role, metabolism, and regulation. *Russ. J. Plant Physiol.*, 2006, **53**, 583-604.
38. Kenten,R.H., Mann,P.J.G. The oxidation of amines by extracts of pea seedlings. *Biochem. J.*, 1952, **50**, 360-369.
39. Padiglia,A., Medda,R., Lorrai,A., Paci,M., Pedersen,J.Z., Boffi,A., Bellelli,A., Finazzi-Argo,A., Floris,G. Irreversible inhibition of pig kidney copper-containing amine oxidase by sodium and lithium ions. *FEBS J.*, 2001, **268**, 4686-4697.
40. Padiglia,A., Medda,R., Pedersen,J.Z., Finazzi-Argo,A., Lorrai,A., Murgia,B., Floris, G. Effect of metal substitution in copper amine oxidase from lentil seedlings. *JBIC*, 1999, **4**, 608-613.
41. Shepard,E.M., Elmore,B.O., Kuchar,J.A., Smith,J., Sayre,M.A., Dooley,D.M. Towards the development of selective amine oxidase inhibitors. Mechanism-based inhibition of six copper containing amine oxidases. *Eur. J. Biochem.*, 2002, **269**, 3645-3658.
42. Peč,P., Frébort,I. 1,4-Diamino-2-bytene as the mechanism-based pea diamine oxidase inhibitor. *Eur. J. Biochem.*, 1992, **209**, 661-665.
43. Suresh,M.R., Adiga,P.M. Diamine oxidase of Lathyrus sativus seedlings. Purification and properties. *J. Biosci.*, 1979, **1**, 109-124.
44. Srivastava,S.K., Prakash,V. Purification and properties of pea cotyledon and embryo diamine oxidase. *Phytochemistry*, 1977, **16**, 189-190.

45. Pietrangeli,P., Federico,R., Mondovi,B., Morpurgo,L. Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. *J. Inorg. Biochem.*, 2007, *accepted manuscript*.
46. www.brenda.uni-koeln.de/
47. Luhova,L., Slavik,L., Frébort,I., Halata,M., Peč,P. amine oxidase from *Trigonella Foenum-Graecum* seedlings. *Phytochemistry*, 1995, **38**, 23-25.
48. Tischer,W., Wedekind,F. Topics in current chemistry, immobilized enzymes: methods and applications. Springer Berlin / Heidelberg, 1999, 95-126.
49. Cao,L. Immobilised enzymes: science or art? *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2005, **9**, 217-226.
50. Gupta,R., Chaudhury,N.K. Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: Problems and future prospects. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **11**, 1387-2399.
51. Darder,M., Aranda,P., Hernandez-Velez,M., Manova,E., Ruiz-Hitzky,E. Encapsulation of enzymes in alumina membranes of controlled pore size. *Thin Solid Films*, 2006, **495**, 321-326.
52. Segura-Ceniceros,E.P., Dabek,K.R., Ilyina,A.D. Invertase immobilization on nylon-6 activated by hydrochloric acid in the presence of glutaraldehyde as cross-linker. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2006, **47**, 143-148.
53. Morris,D.L., Campbell,J., Hornby,W.E. A chemistry for the immobilization of enzymes on nylon. *Biochem. J.*, 1975, **147**, 593-603.
54. Rinken,T. Determination of kinetic constants and enzyme activity from a biosensor transient signal. *Anal. Lett.*, 2003, **36**, 1535-1545.
55. Rinken,T., Tenno,T. The dynamic signal lag of amperometric biosensors. Characterisation of glucose biosensor output. *Biosens. Bioelectrons.*, 2001, **16**, 53-59.
56. Cogoni,A., Piras,C., Farci,R., Melis,A., Floris,G. *Hordeus vulgare* seedlings amine oxidase. Purification and properties. *Plant Physiol.*, 1990, **93**, 818-821.